DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.05.003

复制缺陷型人 TPO重组腺病毒的构建与鉴定*

刘 林** (第三军医大学附属新桥医院血液内科) 重庆, 400037
罗成基 粟永平 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所) 重庆, 400038

提 要 目的: 构建并鉴定携带人 TPO基因的复制缺陷型重组腺病毒。方法: 将含全部编码序列的人 TPOcDNA克隆于腺病毒载体穿梭质粒 pCA3的 CMV启动子下游,然后与含有腺病毒基因组的质粒 pBHG10共转染 293细胞,经同源重组产生人 TPO重组腺病毒(AdCMVTPO);体外转染 A549细胞并检测其表达活性。结果: 扩增后获得的病毒滴度达 4.5× 10^9 pfu/ml,经体外转染 A549细胞检测到 TPO的表达。结论: 所构建的重组腺病毒能有效介导人 TPO基因的转移,可望用于造血功能重建的基因治疗研究。

关键词 血小板生成素;腺病毒载体;基因转移;基因治疗
中图法分类号 R394; R349.21; R373.1

将治疗基因有效导入靶细胞并实现其高效表达是基因治疗的关键环节之一。腺病毒载体具有宿主细胞范围广、高转移效率、高滴度、高表达等优点,是目前体内基因治疗研究中应用最为广泛的载体[1]。血小板生成素(Thrombopoietin, TPO)是近年来克隆的一种造血生长因子[2],具有刺激巨核细胞的增殖和分化,促进血小板的生成和释放的功能[3]。重组 TPO可促进放化疗骨髓损伤后血小板的恢复,减少严重出血的发生[4]。因此,构建携带人 TPO基因的复制缺陷型重组腺病毒可用于放化疗损伤后造血功能重建的基因治疗研究。

1 材料与方法

1.1 腺病毒载体系统

为 E1区和 E3区缺失的复制缺陷 5型腺病毒载体,包括 pCA3和 pBHG10(Microbix Inc, Canada)。其中,pCA3为含有人巨细胞病毒启动子(hCMV)并带有 E1区缺失的 5型腺病毒载体的穿梭质粒,pBHG10为带有 E1、E3区及包装信号(ψ)缺失的 5型腺病毒基因组质粒。

1.2 质粒

RC/CMV/TPO质粒(军事医学科学院葛忠良教授馈赠),含有人 TPO基因的 cDNA,全长 1.1 kb。

1.3 细菌和细胞株

菌株 DH5α(本室保存);人胚肾细胞株 293(上海二医大陈诗书教授馈赠);人肺癌细胞株 A549(第三军医大学呼吸研究所胡懿德博士馈赠)。

1.4 其它试剂

脂质体 DOTAP试剂盒(宝灵曼),质粒 DNA大量提取试剂盒(Promega), TaqDNA聚合酶、T4DNA连接酶及限制性内切酶等(宝灵曼、华美)。

1.5 人 TPO重组腺病毒载体的构建

见图 1。以 *EcoRI*+ *XbaI*双酶切并经V型电泳槽回收 TPOcDNA片段,再以相同酶切并回收 pCA3,经定向克隆并转化 DH5α细菌后以 *EcoRI*+ *XbaI*酶切筛选出阳性重组子 pCA3-TPO,大量制备其 DNA。将 pCA3-TPO(10μg)与 pBHG10(1μg)经 DOTAP包装(按试剂盒说明)后共转染 293细胞,上层以 0.5%琼脂覆盖,移至 37℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱中孵育,8~15d后即可观察到病毒空斑的出现。按相同的方法构建无目的基因插入的空载体(AdCMVNull)。质粒的提取、酶切、连接和转化按《分子克隆》第 2版操作。

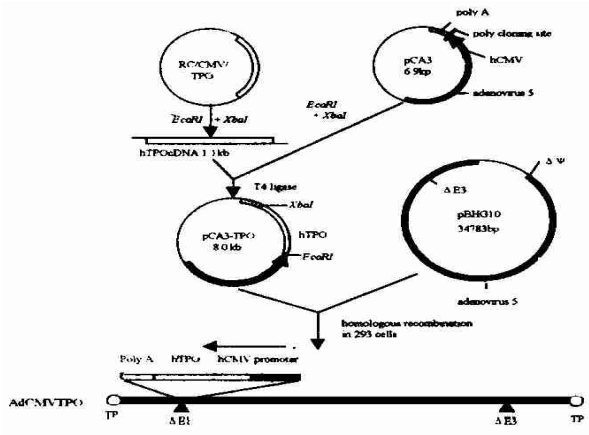


图 1 人 TPO重组腺病毒载体构建流程图
Fig 1 Demonstrative illustration for the construction of human TPO recombinant adenoviral vectors

1.6 空斑鉴定

采用 PCR扩增法。挑取空斑再感染 293细胞,待细胞出现病变时取少量培养液,经蛋白酶 K消化、酚氯仿抽提、乙醇沉淀提取病毒 DNA,进行 PCR扩增。设计两对引物,P1、P2为人 TPO基因引物,P3、P4为腺病毒特异引物,序列如下。

P1: 5′-CTCTAGTCCTCACACTGAACG-3′
P2: 5′-AAGGAGAATATCCAGGCTGG-3′
P3: 5′-TCGTTTCTCAGCAGCTGTTG-3′
P4: 5′-CATCTGAACTCAAATCGTGG-3′

* 重庆市应用基础研究基金资助项目
** 刘 林,男,35岁,主治医师,讲师,博士研究生

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

PCR反应体积为 50μl,引物浓度为 0.4μmol/L,扩增参数为 94℃ 90 s 60℃ 60 s 72℃ 60 s, 35个循环,72℃延伸 7 min 各取 10μl反应产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.7 重组腺病毒的扩增与滴度检测

将重组腺病毒再感染 293细胞进行扩增,收集病变细胞,在 -70℃反复冻融 3次,于 4℃,5 000 r/min离心 20 min,取上清,用 0.22μm的微孔滤器过滤,-70℃保存备用;病毒滴度检测采用空斑法[5]。

1.8 重组腺病毒感染 A549细胞及 TPO活性的检测

在对数生长期的 A549细胞中加入 AdCMV TPO,按 20感染强度 (Multiplicity of infection, MOI)感染细胞。1.5 h后去除病毒液,加入新鲜培养基,48 h后收集培养上清,检测 TPO活性。取上清液 0.5 ml经皮下注射至正常 Balb/c小鼠体内,每日 1次,连续 3 d,于实验第 0 3 6 9 12 15 18 25天经断尾取血检测血小板计数。以相同剂量 AdCMV Null感染的 A549细胞培养上清液及 DMEM注射为对照。每组小鼠数量为 6只。

2 结果

2.1 重组质粒酶切鉴定结果

pCA3-TPO质粒经 *EcoRI* 和 *XbaI* 酶切后获得正确大小的片段,为阳性重组子,见图 2

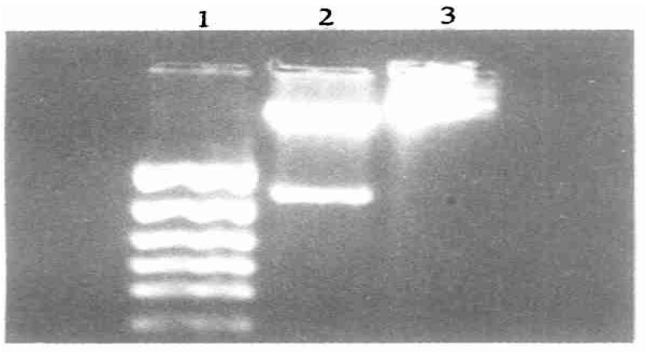


图 2 重组质粒的酶切分析

Fig 2 Digestive analysis for the recombinant plasmid

Lane 1: PCR marker; Lane 2: *EcoRI* and *XbaI* digest of the recombinant plasmid; Lane 3: Plasmid pCA3

2.2 病毒空斑 PCR扩增结果

经 10~15 d孵育后培养皿共出现 5个空斑,分别提取每个空斑的病毒 DNA进行双引物 PCR扩增,结果均出现 2条带,分别在 0.32 kb和 0.86 kb处,为阳性空斑,即携带人 TPO基因的重组腺病毒,见图 3

2.3 重组腺病毒滴度测定结果

AdCMV TPO和 AdCMV Null经繁殖、扩增后空斑法测定滴度分别为 4.5×10⁹ pfu/ml及 5.2×10⁹ pfu/ml。

2.4 重组腺病毒介导的 TPO体外表达

TPO测定结果表明,感染 AdCMV TPO的 A549细胞培养上清注射组小鼠血小板计数于第 3天开始逐渐升高,持续约两周后降至对照组水平,峰值较对照组增高约 2倍,见图 4,证明所制备的人 TPO重组腺病毒在体外能高效表达 TPO。

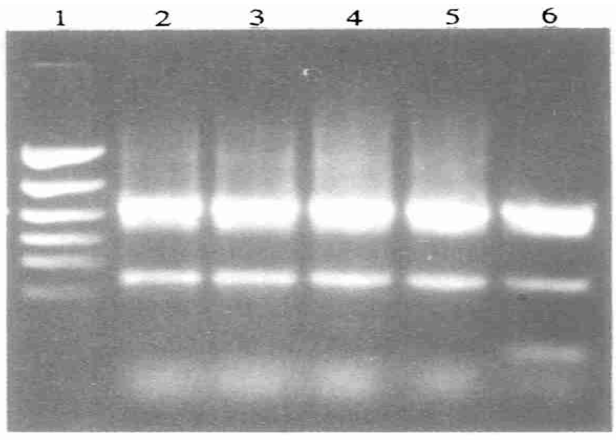


图 3 病毒空斑的 PCR扩增结果

Fig 3 PCR products of the adenoviral plaques

Lane 1: PCR marker; Lane 2~6: Positive plaques

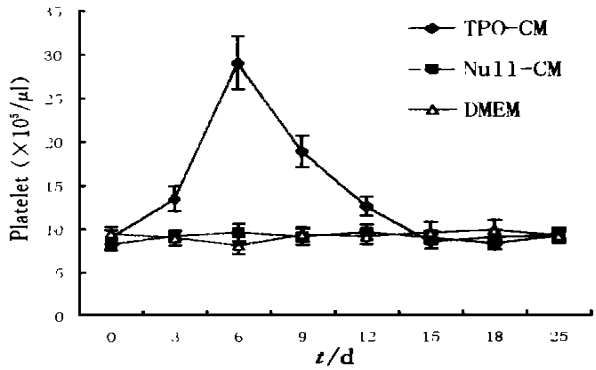


图 4 重组腺病毒介导的人 TPO体外表达活性检测

Fig 4 *In vitro* evaluation of the expression of human TPO mediated by the recombinant adenovirus

TPO-CM: Conditioned medium of AdCMV TPO infected cells; Null-CM: Conditioned medium of AdCMV Null infected cells

3 讨论

利用病毒具有与细胞表面受体结合并将其基因组导入宿主细胞的特性,将控制病毒复制的基因及部分病毒复制非必须基因去除后可制备成各种病毒载体。目前已开发的病毒载体主要有逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺伴随病毒载体、单纯疱疹病毒载体等,其中,以逆转录病毒载体及腺病毒载体最常用。由于逆转录病毒载体能携带外源基因整合进靶细胞的基因组内,实现目的基因的长期稳定表达,因而主要用于体外的基因治疗研究。但是,由于外源基因的插入有导致基因突变的危险,因此,具有潜在的遗传毒性。此外,逆转录病毒只能感染分裂增殖的细胞,且繁殖滴度低、性质不稳定,不能满足体内基因治疗的需要。

腺病毒载体具有宿主细胞广泛、可感染静止及分

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

裂期细胞、繁殖滴度高、性质稳定、包装容量大及不整合等优点,因而成为继逆转录病毒之后被广泛应用的病毒载体,主要用于体内基因治疗研究。在本研究中,我们构建的 AdCMVTPO是 E1、E3区缺失的复制缺陷 5型腺病毒。由于 E1区基因为腺病毒复制所必需,因此需要由转化了 E1区基因的包装细胞即人胚肾 293细胞提供反式补偿才能复制和扩增。这种复制缺陷的重组腺病毒仍具有感染靶细胞的能力但不发生复制,因而不会直接造成靶细胞的损害。

由于腺病毒基因组较大(36 kb),不便于直接进行分子克隆,因此,在构建腺病毒载体时,通常将腺病毒基因组左端制备成含 E1区缺失的穿梭质粒(如本研究采用的 pCA3),将目的基因插入其多克隆位点后再与含腺病毒基因组的质粒(本研究采用 pBHG10)共转染至 293细胞内进行同源重组。由于在 pBHG10中包装信号(Ψ)缺失不能被包装成病毒[5],必须与含包装信号的 pCA3重组后才能形成感染性病毒,因此,有重组病毒生成后形成的空斑大多为含有目的基因的阳性空斑。本研究中所筛选的 5个空斑均为阳性,证实这种重组方法的有效性。

传统的重组腺病毒载体鉴定方法是通过提取腺病毒感染后产生病变的 293细胞的 DNA,经限制性内切酶消化鉴定[6],操作较繁琐且灵敏度较低。本研究应用 PCR共扩增技术,在同一 PCR体系中加入 TPO基因特异性引物和腺病毒特异性引物,可迅速、准确地鉴定出阳性噬斑。重组腺病毒载体的成功构建主要取决于以下两个关键环节:① 用于共转染 293细胞的质粒应具有较高的纯度(超螺旋质粒占 80%以上);② 采用低传代的 293细胞(传代数在 40代以内),因为随传代数的增加,293细胞将逐渐丧失其反式补偿功能,不能为 E1区缺失的腺病毒载体有效地提供 E1区蛋白从而降低同源重组的效率。

血小板减少是肿瘤患者放化疗过程中的常见并发症,目前主要的治疗方法是输注血小板悬液及支持治疗。但是由于血小板寿命短及机体产生抗血小板抗体等问题,因而治疗效果不理想[7]。TPO为近年来克隆的一种造血生长因子,对巨核细胞系的增殖和血小板的生成发挥基础性的调控作用。将重组 TPO用于放化疗导致的骨髓损伤可促进巨核系造血的重建。我们所制备的人 TPO复制缺陷重组腺病毒体外感染人肺癌细胞株 A549细胞后,转染细胞培养上清液可显著的促进正常 Balb/c小鼠血小板计数升高,证明 AdCMVTPO可有效的介导人 TPO表达,为进一步开展放化疗损伤后造血功能重建的基因治疗研究奠定了基础。

参考文献

1 Richard C, Mulligan. The basic science of gene therapy. Science, 1993, 260(5110): 926

2 Bartley T D, Bogenberger J, Hunt P, *et al*. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokin receptor Mpl. Cell, 1994, 77(7): 1117

3 Eaton D L, de Sauvage F J. Thrombopoietin: the primary regulator of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis. Exp Hematol, 1997, 25(1): 1

4 Hokom M M, Lacey D, Kinstler O B, *et al*. Pegglated megakaryocyte growth and development factor abrogates the lethal thrombocytopenia associated with carboplatin and irradiaton in mice. Blood, 1995, 86(11): 4486

5 Bett A J, Haddara W, Prevec L, *et al*. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with inserts or deletions in early regions 1 and 3. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(19): 8802

6 Graham F L, Prevec L. Methods for construction of adeno virus vectors. Mol Biotechnol, 1995, 3(3): 207

7 Lok S, Foster D C. The structure, biology and potential therapeutic applications of recombinant thrombopoietin. Stem Cells, 1994, 12(5): 586

(收稿: 1999-02-03;修回: 1999-04-07)

(编辑 王 红)

Construction and identification of replication-deficient human thrombopoietin recombinant adenoviruses

Liu Lin, Luo Chengji, Su Yongping (Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037)

Abstract Objective: To construct and identify the replication- deficient human thrombopoietin (TPO) recombinant adenoviruses (AdCMVTPO). Methods: The full-length human TPO encoding TPO cDNA was cloned at the down stream of human CMV promoter of adenoviral shuttle plasmid pCA3. Then the resultant pCA3-TPO was cotransfected into 293 cells with the plasmid pBHG10 carrying the adenoviral genome. The

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

AdCMVTPO was successfully generated with homologous recombination. A549 cells were infected with AdCMVTPO and the expression of human TPO was evaluated *in vivo*. **Results:** The titer of AdCMVTPO reached 4.5×10^{9} pfu/ml after amplification in 293 cells. A549 cells expressed high level of human TPO after infection. **Conclusion:** The constructed recombinant adenovirus can mediate the human TPO gene transfer efficiently and can be used in the gene therapy of hemopoietic reconstruction.

Key words thrombopoietin; adenovirus; gene transfer; gene therapy

肾上腺节细胞神经瘤 2例报告

Report on two cases of ganglioneuroblastorna of adrenal gland

余阎宏* 宋 波 熊恩庆 邹永康** 齐书武**

(第三军医大学附属西南医院泌尿外科) 重庆, 400038

肾上腺节细胞神经瘤罕见,而分泌儿茶酚胺者则更为罕见。1992年 4月至 1996年 9月,我们共收治肾上腺节细胞神经瘤 2例,其中 1例有内分泌功能。现报告如下。

1 临床资料

例 1,男, 48岁,无症状。B超发现左肾上腺 3.5 cm× 3.0 cm低回声均质占位,包膜完整, CT示 4.5 cm× 4.3 cm均质低密度占位, CT值 29 Hu。术中见肾上腺肿瘤光滑无粘连,行肿瘤切除术。病理诊断:节细胞神经瘤。

例 2,女, 28岁,左腰隐痛 3年,无高血压史, B超示左肾上腺 7.6 cm× 7.8 cm低回声不均质占位,包膜完整。CT示 8.3 cm× 7.5 cm不均质低密度占位, CT值 29~ 36 Hu。增强稍强化。尿 VMA 3次均高,平均 139.1μmol/L,尿 17-OH, 17-Ks稍高,分别为 14.1 mg/24 h及 30.4 mg/24 h。术中肾上腺肿瘤光滑无粘连。术中术后血压无明显波动,术后 VMA 17-OH 17-Ks恢复正常。病理诊断:节细胞神经瘤。

2 讨论

2.1 病理特点

本瘤多为良性,好发于青少年,一般无内分泌功能,主要由分化成熟的神经节细胞及神经鞘细胞、神经纤维构成。如肿瘤由未分化的神经母细胞构成,诊断为神经母细胞瘤,如细胞分化介于二者之间,则诊断为节神经母细胞瘤。此二种瘤均属恶性,好发于婴幼儿,多能分泌儿茶酚胺,尿 VMA高于正常,可伴高血压,早期即可浸润转移。一般认为上述 3种肿瘤为同一起源肿瘤的不同分化阶段,甚至有报道同一瘤体内,不同局部可见 3种肿瘤的典型病理特点共存[1,2],故应多处取材切片,以免误诊。本组 2例均病理确诊。

2.2 临床诊断

本病常无特殊症状,就诊时往往瘤体较大,影象学检查有以下特点, B超回声低,包膜完整, CT因神经细胞含脂质高,呈边界清楚的低密度占位。CT值 12.6~ 86 Hu之间,因瘤体血供不丰富,强化不明显[3],行血管造影显示少血管网占位, MRI示长 T_1、长 T_2 信号, T_1 加权为均匀低信号, T_2 加权为高信号,可伴条片状低信号[4]。本组 2例 CT、B超均符合上述特点。确诊靠病理诊断。

本瘤多无分泌功能,但约 10%病例尿 VMA高,血、尿儿茶酚胺亦高,以多巴胺为主,部分伴高血压。本组 1例尿 VMA高,无高血压,是否因肿瘤大量分泌多巴胺,抢占了α受体,或酶活性异常,致使儿茶酚胺代谢成无活性物质,原因尚难确定。该患者尿 17-OH, 17-Ks均高,但无皮质功能亢进表现,原因不明。文献[5]有类似报告。因分泌儿茶酚胺的节细胞神经瘤及其它神经源性肿瘤与嗜铬细胞瘤鉴别困难,故主张凡尿 VMA升高者均应按后者行术前准备。

2.3 治疗与预后

多数学者主张手术治疗[2,5],肿瘤切除即可治愈,预后良好。本组 2例均顺利切除肿瘤,随访至今无肿瘤复发,血压正常。有报道肿瘤与周围粘连浸润[5],从本病病理分化特点推测,此类患者术后应严密随访,警惕肿瘤复发、恶变。伴内分泌功能者,亦应加强随访,均不能满足于病理提示的良性肿瘤诊断。

关键词 肾上腺;节细胞瘤

中图法分类号 R736.6

参考文献

1 Adam A, Hochholzer L. Ganglioneuroblastoma of the posterior mediastinum, a clinicopathologic review of 80 cases. Cancer, 1981, 47(2): 373

2 胡继庭,陈维鹏,韩乃刚.现代肿瘤外科学.北京:中国科技出版社, 1994. 466~ 468

3 郑军华,闵志廉,雷华良,等.肾上腺肿瘤影象学诊断与病理组织学类型关系(附 32例分析).中华泌尿外科杂志, 1997, 18(9): 515

4 隋邦森,吴恩惠,陈雁冰.磁共振诊断学.北京:人民卫生出版社, 1994. 635~ 636

5 徐丹枫,闵志廉,朱有华,等.肾上腺节细胞神经瘤(附 6例报告).中华泌尿外科杂志, 1996, 17(11): 652

(收稿: 1998-11-25;修回: 1999-03-31)

(编辑 汪勤俭)

* 余阎宏,男, 35岁,主治医师,学士,云南省人民医院泌尿科 昆明, 650031

** 云南省人民医院泌尿科 昆明, 650031

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net